昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, April 2004, 47(2): 273 – 276　　ISSN 0454-6296

检测 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中家蝇蛋白的新方法——海波银染法

安春菊, 耿　华, 李德森, 杜荣骞

（南开大学生命科学学院, 天津　300071）

摘要: 介绍一种检测 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳中家蝇幼虫蛋白的新方法——海波银染法。该方法对传统银染方法中的试剂与步骤加以改进, 省略了乙醇固定与洗涤步骤, 只需 20 min 即可完成全部染色过程, 且仅在国产分析纯试剂及普通操作条件下, 灵敏度可达毫微克级水平。

关键词: SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 考马斯亮蓝染色; 蛋白质银染

中图分类号: Q965　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2004)02-0273-04

A new silver staining method for proteins of housefly in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

AN Chun-Ju, GENG Hua, LI De-Sen, DU Rong-Qian (College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: A new $Na_2S_2O_4$ silver staining method is described for detecting the proteins of housefly separated by SDS-PAGE. In this staining method, besides the regents and steps are different from the classical silver staining method, fixation and ethanol washing are not necessary. Only twenty minutes were needed to complete the whole staining process. This method has a low demand for regents and manipulation, but can still reach the sensitivity level of nanogram.

Key words: SDS-PAGE; Coomassie brilliant blue staining; protein silver staining

家蝇 *Musca domestica* 既是一种重要的医学昆虫, 也是一种重要的资源昆虫, 据柏鸣和周立(2001)报道, 家蝇幼虫经过诱导后, 体内会产生一些有广谱抗菌活性的蛋白/多肽。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)技术是蛋白质分析中最常用的手段之一。SDS-PAGE 分离后的蛋白条带, 通常采用考马斯亮蓝进行染色。20 世纪 80 年代产生了一种更为敏感的染色方法——银染法(Switzer *et al.*, 1979)。近几年又相继报道了许多改进的银染方法, 包括二胺银染法、无二胺银染法、照相银染法、负片银染法和正片银染法(李永明等, 2001)。我们在分离纯化家蝇幼虫抗菌蛋白/多肽的过程中发现了一种新的蛋白质银染方法, 该方法灵敏度高、相关性好、快速简便, 称之为海波银染法。

1　材料和方法

1.1　材料

家蝇幼虫由本实验室饲养。供试大豆品种合丰 22 号、合丰 25 号、合丰 26 号、合丰 29 号、东农 40 号和黑河 4 号, 由吉林省农业科学院大豆研究所惠赠。按照安春菊等(2003)的方法提取家蝇幼虫、合丰 22 号、合丰 25 号、合丰 26 号、合丰 29 号、东农 40 号和黑河 4 号的总蛋白, 依次记为 Pr、P_{22}、P_{25}、P_{26}、P_{29}、P_{40} 和 P_4; 低分子量标准蛋白购自 Pharmacia 公司, 牛血清白蛋白(BSA)购自 Biotech 公司。

DYY-2 型稳压稳流电泳仪和 DYCZ-28B 型垂直电泳槽购自北京六一仪器厂, Image Master VDS 系统购自瑞士 Pharmacia Biotech 公司。

1.2　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

采用不连续体系(Sambrook *et al.*, 1996), 浓缩胶浓度为 3.75%, 分离胶浓度为 15%, 110 V 恒压电泳至指示剂进入分离胶后, 以 220 V 恒压电泳至指示剂距胶底约 1 cm 时结束电泳。

1.3　染色方法

电泳完毕后, 将同一块胶纵剖成三块, 分别按以

基金项目: 天津市自然科学基金项目(033604911)

作者简介: 安春菊, 女, 1977 年 3 月生, 湖北襄樊人, 博士, 主要从事昆虫功能蛋白的分离纯化及相关基因克隆的研究, E-mail: jjuuaa@eyou.com

收稿日期 Received: 2003-06-26; 接受日期 Accepted: 2003-09-19

下三种方法进行。①考马斯亮蓝染色：按照Bradford(1976)的方法进行。②传统银染法：按照Sambrook等(1996)的方法进行。③海波银染法：电泳结束后，取胶，用蒸馏水剧烈冲洗3次，每次30 s→加入0.02%的$Na_2S_2O_4$，轻摇1 min→用蒸馏水彻底洗3次，每次30 s→加入约5倍胶体积的染色液(0.2% $AgNO_3$ + 0.075%甲醛)，轻摇15 min→倾去染色液，用蒸馏水洗涤30 s→加入约6倍胶体积的显色液(6% $NaCO_3$ + 0.05%甲醛 + 0.0004% $Na_2S_2O_4$)，轻摇1～3 min至带出现→加入约6倍胶体积的终止液(5%冰乙酸)停止显色反应。

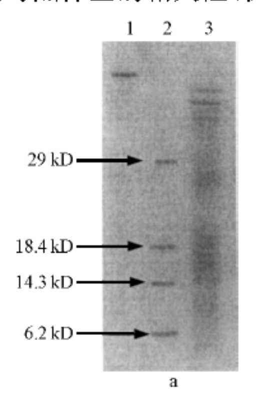
1.4 凝胶染色后图象分析

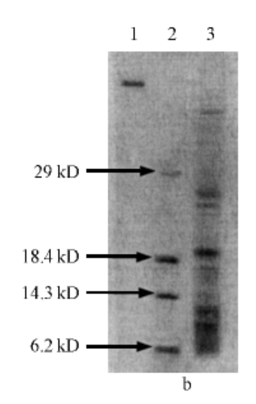
将染色后的凝胶用Image Master VDS系统扫描分析，分别测定不同点样量的BSA带的积分光密度值(IOD值)，用此IOD值表示染色强度。用统计分析软件SAS(Statistical Analysis System)6.12版分析染色强度与点样量的相关性(杜荣骞，1999)。

2 结果与分析

2.1 三种方法染色效果的比较

在上样量和电泳条件及照相条件完全相同的情况下，3种方法的染色结果见图1。由此可以看出，海波银染法所显示的蛋白带最清晰，考马斯亮蓝染色的效果最差。海波银染法与传统银染法相比，分子量在14 kD以上的蛋白带前者染色效果较好，14 kD以下的蛋白带后者染色效果较好，重复实验结果表明海波银染法更适合较大分子量的蛋白染色。此外，常规考马斯亮蓝染色需较长时间，一般8～10 h，有时还需过夜。传统银染方法所需时间相对有所缩短，一般2～4 h。而本文介绍的海波银染法摒弃了上述两种方法中繁琐的固定与洗涤步骤，在灵敏度不变的情况下仅需20 min，快速简便，大大提高了工作效率。





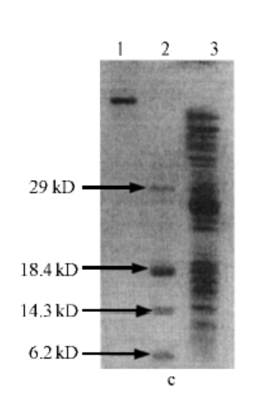


图1 三种方法染色效果的比较

Fig. 1 Comparison of the staining results of three methods

a：考马斯亮蓝染色 CBB staining；b：传统银染法 Classical silver staining；c：海波银染法 $Na_2S_2O_4$ silver staining；1. 牛血清白蛋白 BSA；2. 分子量标准蛋白 Marker；3. 蛋白 Protein.

2.2 海波银染法的灵敏度

将牛血清白蛋白进行梯度稀释，使样品含量分别为1.0 μg、0.5 μg、0.3 μg、0.1 μg、0.05 μg、0.025 μg、0.0125 μg、0.00625 μg，经海波银染法染色后，肉眼仍依稀可见点样量为0.00625 μg的蛋白条带(图2)。可见海波银染法尽管省略了许多步骤，非常简便，但灵敏度所受影响不大，其检出极限仍可达毫微克级水平。

此外，我们用该方法对提取的不同大豆品种籽粒的蛋白进行染色，从图3可以看出，海波银染法染色后能够看出不同品种大豆籽粒的蛋白表达上存在着差异(如图3箭头所示)，从另一方面说明了海波银染法的灵敏度足以满足生化实验的一般要求。

2.3 海波银染法中染色强度与蛋白含量间的相关性

海波银染法中染色强度与点样量之间存在一定的相关性(表1)。以表1中的点样量为自变量，染色强度为因变量，应用SAS软件进行统计学分析。经过几种拟合后，发现在本研究范围内染色强度与点样量之间呈二次多项式回归关系或线性回归关系，回归方程分别为 $\hat{Y} = 43.013X^2 + 417.75X - 6.0572$，$\hat{Y} = 458.73X - 8.9928$。它们的相关指数分别为 $R^2_{(二次多项式)} = 0.9712$，$R^2_{(线性)} = 0.9705$，由相关指数可见这两种拟合方式均能说明染色强度与蛋白质

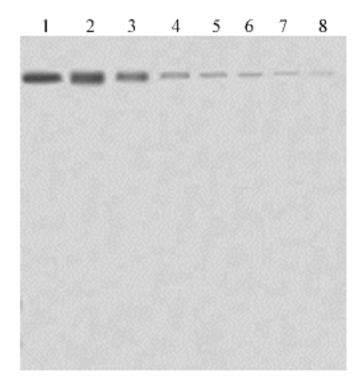


图 2 海波银染法的灵敏度检测

Fig. 2 Detection of sensitivity of $Na_2S_2O_4$ silver staining method

1. 1.0 μg; 2. 0.5 μg; 3. 0.3 μg; 4. 0.1 μg; 5. 0.05 μg; 6. 0.025 μg; 7. 0.0125 μg; 8. 0.00625 μg.

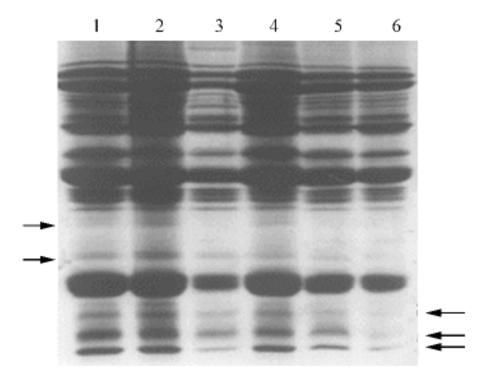


图 3 大豆蛋白 $P_{22}-P_{40}$的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 3 Result of SDS-PAGE about $P_{22}-P_{40}$

1. P40; 2. P4; 3. P29; 4. P26; 5. P25; 6. P22.

表 1 海波银染法中染色强度与点样量之间的关系

Table 1 The relation of staining intensity and drip quantity in $Na_2S_2O_4$ silver staining method

点样量(μg) Drip quantity	染色强度(IOD) Staining intensity	点样量(μg) Drip quantity	染色强度(IOD) Staining intensity
1.0	447.78	0.05	14.390
0.5	260.63	0.025	10.813
0.3	70.649	0.0125	8.2184
0.1	24.606	0.00625	5.5620

点样量具有很好的相关性，用该方法能从染色深浅上较为准确地判断出蛋白质含量的多少。

3 讨论

蛋白质银染的确切机理还不十分清楚，一般认为是银离子与蛋白质以盐或配价络盐的形式结合，然后甲醛将银离子还原为可见的银颗粒，进而显示出蛋白带来(Switzer *et al*., 1979)。本文介绍的海波银染法是在 Switzer 银染法(Switzer *et al*., 1979)的基础上，参照国内学者对银染法的改进(朱平等，1999；谭魏等，1999)总结出来的。与其他蛋白质染色方法相比，本方法省略了乙醇固定与洗涤的步骤，非常简便快速，但不影响其灵敏度，并且该方法对仪器及试剂的要求较低，全部操作过程均可在室温下进行，无需加温处理；所用的化学试剂种类少且均为国产分析纯，所用的水均为普通蒸馏水。这一方面在一定程度上减轻了工作量，另一方面也为一些实验条件不足的实验室提供了一种检测方法。

本实验还发现，海波银染法有以下几个应注意的问题：(1)电泳完毕，取胶后应用蒸馏水反复冲洗几次，一方面可以避免电泳缓冲液干扰染色结果，另一方面也可以尽可能地去除凝胶中的 SDS，以避免显色反应时出现黄色的背景而影响后续的扫描分析。(2)显色液中 Na_2CO_3 的浓度对染色背景有一定的影响，随着 Na_2CO_3 浓度的增大，凝胶背景将逐渐降低，本实验选用 2%、4%、6% 三个浓度中，以 6% Na_2CO_3 的效果最好。此外，实验证明染色前和染色过程中加入的 $Na_2S_2O_4$ 与银离子形成可溶性络合物，可以减小显影过程中的背景染色，大大提高成像质量。(3)实验过程中所有要加甲醛的溶液必需现用现配，不能预先配好，因为甲醛在空气中易挥发，导致实际使用时甲醛的浓度不足。

此外，我们用该方法对提取的不同大豆品种籽粒的蛋白进行染色，染色效果也较好。由此可见，海波银染法不仅适用于动物蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色，也适用于植物蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色，有着较为广泛的适用性。

参 考 文 献(References)

An CJ, Shi M, Hao YJ, Li DE, Du RQ, 2003. The inducement and activity analysis of antibacterial-relative proteins/peptides in housefly larvae. *Acta Entomol. Sin.*, 46(5): 545－548.[安春菊，石明，郝友进，李德森，杜荣骞，2003. 家蝇幼虫抗菌相关蛋白/多肽的诱导及抗菌活性分析. 昆虫学报，46(5): 545－548]

Bai M, Zhou L, 2001. Purification of a kind of antibacterial protein from *Musca domestica*(housefly) larvae. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 7(6): 568－571.[柏鸣，周立，2001. 家蝇抗菌蛋白的分离纯化及部分性质. 应用与环境生物学报，7(6): 568－571]

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248－254.

Du RQ, 1999. Biostatistics. Beijing: Higher Education Press; Heidelberg: Springer-Verlag Press. 177－251.[杜荣骞，1999. 生物统计学. 北

京：高等教育出版社;海德堡：施普林格出版社联合出版.177－251]

Li YM，Zhao YQ，Yang JH，Wang MJ（Translated by Li DD，Chen W，Wang YG），2001. An Applied Manual in Molecular Biology. Beijing: Science Press. 351－352.[李永明，赵玉琪，杨京华，王明静(李电东，陈巍，王以光译)，2001. 实用分子生物学方法手册. 科学出版社. 351－352]

Sambrook J，Fritsch E，Maniatism T（Translated by Jin DY，Li MF，Hou YD），1996. Molecular Cloning: a Laboratory Manual（second edition）in Chinese. Beijing: Science Press. 880－885.[Sambrook J，Fritsch E，Maniatism T（金冬雁,黎孟枫,侯云德译），1996. 分子克隆实验指南(第二版). 北京：科学出版社. 880－885]

Switzer RC，Merrill CR，Shifrin S，1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*，98：231.

Tan W，Li Q，Wang Y，Wang SF，Wang NN，1999. PAGE-silver staining technique for different display of change in gene expression. *Plant Physiology Communication*，35(6)：477－481.[谭巍，李强，王勇，王淑芳，王宁宁，1999. 显示基因表达差异的PAGE-银染技术. 植物生理学通讯，35(6)：477－481]

Wang Y，Du RQ，Zhao SR，1999. Studies on relation between salt-tolerance and specific proteins expressed under salt stress in *Sorghum*（*Sorghum vulgare* Pers.）. *Acta Agronomica Sinica*，25(1)：76－81.[王颖，杜荣骞，赵素然，1999.高粱在盐胁迫下特定蛋白的表达及与耐盐性关系的研究.作物学报，25(1)：76－81]

Zhu P，Xiao HW，Zhang AL，Huang SQ，1999. An improved silver staining method in assays of protein in SDS-PAGE. *Acta Guangzhou Junior Medical College*，22(2)：115－117.[朱平，肖浩文，张爱玲，黄树其，1999.检测聚丙烯酰胺凝胶中蛋白质的一种改进型银染法.广州医学高等专科学校学报，22(2)：115－117]

（责任编辑：黄玲巧）